

PENGUNAAN ENZIM *Bacillus megatorium* DSM-319 PADA PROSES PERENDAMAN PENYAMAKAN KULIT JAKET

UTILIZATION OF *Bacillus megatorium* DSM-319 FOR SOAKING PROCESS OF JACKET LEATHER

R. Jaka Susila*, Emiliana Kasmudjiastuti, Sri Sutiasmi
Balai Besar Kulit, Karet, dan Plastik, Yogyakarta
*E-mail: susilajaka@yahoo.com

Diterima: 18 Oktober 2013 Direvisi: 20 Desember 2013 Disetujui: 24 Desember 2013

ABSTRACT

The purpose of the study was to obtain eco-friendly soaking process for goatskin and to shorten the soaking time. The enzyme used in the soaking process was Bacillus megatorium DSM-319, with enzyme concentration of 0.5, 1, and 1.5% and soaking time of 1, 1.5, and 2 hours. Each sample were tested for skin histology observation using photomicrograph, protein concentration analysis, tensile strength, elongation, colour fastness (dry and wet) and flexibility. The results showed that protein content of goat skin was decreased 42.32% after optimum soaking with 1% enzyme for one hour. The results of the physical testing of jacket leather with optimum soaking process met the quality requirements of SNI 4593:2011 Sheep/goat jacket leather.

Keywords: Bacillus megatorium DSM-319, enzyme, soaking, goatskin, jacket

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan proses perendaman kulit kambing yang ramah lingkungan dan untuk mempersingkat waktu proses perendaman. Enzim *Bacillus megatorium* DSM-319 digunakan dalam perendaman dengan konsentrasi enzim berturut turut 0,5; 1 dan 1,5% dan variasi waktu berturut turut 1; 1,5 dan 2 jam. Evaluasi keberhasilan proses perendaman dilakukan dengan pengamatan histologi kulit menggunakan fotomikrograf, analisis kadar protein, kekuatan tarik, kemuluran, ketahanan gosok cat (kering dan basah) dan kelenturan. Hasil analisis kadar protein menunjukkan bahwa kadar protein kulit kambing setelah perendaman optimal pada konsentrasi enzim 1% selama 1 jam dengan penurunan sebesar 42,32%. Hasil uji fisika kulit jaket dari kulit kambing hasil perendaman dengan konsentrasi enzim sebesar 1% selama 1 jam telah memenuhi persyaratan mutu yang sesuai dengan SNI 4593:2011 Kulit jaket domba/kambing.

Kata kunci: *Bacillus megatorium* DSM-319, enzim, perendaman, kulit kambing, jaket

PENDAHULUAN

Proses perendaman merupakan tahap awal proses penyamakan kulit yang lazim dilakukan. Tujuan proses perendaman adalah untuk menjadikan kondisi kulit mentah ataupun kulit awetan dalam air agar lebih bersih dan lentur seperti keadaan pasca pengulitan. Selama proses perendaman terjadi pengembalian kandungan air kulit yang berkurang saat pengawetan, pembasahan kembali protein yang telah kering

dan penghilangan bahan tersegmentasi antar serabut. Proses perendaman kulit menggunakan air dan umumnya ditambah bahan pembantu berupa bahan-bahan kimia untuk penyabunan dan pelarut protein.

Pada saat ini industri kulit dibawah tekanan regulasi tentang lingkungan, sehingga dianjurkan untuk menerapkan teknologi bersih diantaranya penggunaan enzim dalam proses. Enzim yg digunakan dalam industri

kulit diantaranya protease, lipase dan elastase (D'souza and Killedar, 2008). Keuntungan menggunakan enzim pada proses perendaman antara lain membantu menghilangkan *scudd*, membantu membuka struktur serabut, mengurangi kerutan pada *grain*, mengurangi waktu proses perendaman, menaikkan luas area, dan mengurangi penggunaan bahan kimia (Sanghi and Singh, 2012). Enzim telah dicoba dimanfaatkan dalam berbagai proses penyamakan, diantaranya perendaman (Zambare *et al.*, 2013), penghilangan bulu (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2012; Dettmer *et al.*, 2011), penghilangan lemak (Saran *et al.*, 2013), dan pengecatan (Kanth *et al.*, 2009).

Spesifitas enzim ditentukan oleh kemampuannya menguraikan ikatan-ikatan dalam suatu senyawa. Substrat enzim spesifik tergantung jenis, misal enzim proteolitik mempunyai kemampuan menghidrolisis ikatan-ikatan peptida dalam protein. Tripsin mampu menghidrolisis ikatan peptida dengan gugus L-arginin atau L-lisin.

Alkaline protease pada umumnya diperoleh dari binatang, tanaman, jamur dan bakteri. Pemakaian enzim protease pada proses perendaman kulit akan meningkatkan sifat afinitas untuk pewarnaan, kerataan warna, penetrasi warna ke dalam penampang kulit, penyerapan zat warna, mengurangi susut luas kulit dan meningkatkan kelenturan kulit jadinya.

Perendaman dalam air dingin yang normal biasanya sekitar 2-3 hari. Waktu perendaman tergantung pada ketebalan kulit, metode *curing*, dan komposisi bahan kulit. Perendaman menggunakan enzim akan menyebabkan protein globular dalam kulit terdegradasi dan air menempati rongga yang ada pada jaringan kulit sehingga kondisi kulit menjadi basah kembali seperti keadaan kulit segar. Perlakuan lanjut akan menimbulkan perubahan struktur kolagen menjadi lebih terbuka sehingga kolagen siap berikatan dengan bahan penyamak. Penambahan senyawa basa pada media perendaman akan mempercepat penghilangan lapisan epidermis dan bulu serta pelarutan protein globular yang berada diantara serat-serat protein.

Dilaporkan bahwa penggunaan alkaline protease untuk perendaman kulit dapat memecah

protein terlarut dari sisi matriks dan melepaskan garam dan asam hyluarat. Sebagai dampak adalah air diserap oleh kulit yang difasilitasi oleh alkaline protease pada pH alkali (Kamini *et al.*, 1999). De Souza and Gutterres (2012), melakukan penelitian tentang penggunaan koenzim pada proses perendaman dan pelepasan bulu, dan hasil yang didapatkan lebih baik bila dibandingkan dengan penggunaan proses kimia, sedangkan menurut Qiang *et al.* (2009), proses perendaman dan pengapuran dengan enzim menghasilkan limbah yang sifatnya lebih mudah rusak oleh mikrobia. Potensi berbagai enzim untuk membantu perendaman kulit juga telah diteliti, diantaranya tentang penggunaan enzim protease M-1, M-3 dan FM-2 (Dangge *et al.*, 2010) dan enzim CMI (Xiaoyang *et al.*, 2008).

Enzim protease dari *Bacillus megaterium* telah diketahui mampu menghidrolisis albumin, hemoglobin, gelatin, kolagen, dan keratin (Wahyuntari dan Hendrawati, 2012). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi perendaman kulit kambing yang optimum agar ramah lingkungan dan mempersingkat waktu perendaman.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri atas kulit kambing awetan garam dari salah satu pengepul kulit di Yogyakarta sebanyak 30 lembar, bahan kimia untuk proses penyamakan kulit antara lain Sandozin NIL, Na_2S , NaOH, biakan bakteri *Bacillus megaterium* DSM-319, garam, oropon, kapur, asam formiat, asam sulfat, Kromosal B, soda kue, soda abu, mimosa, Novaltan PF, Tanigan OS, Relugan GT 50, Retingan R7, Sandolix WWL, Licrol SB, Ebotan AC, anti jamur, dan minyak sulfonasi. Semua jenis bahan kimia yang digunakan untuk proses kulit berkategori teknis. Bahan kimia dan bahan lain untuk uji kulit: L tyrosin, chapek agar, metilen biru, gram violet, H_2O_2 , fero amonium sulfat, Na_2SiO_3 , HCl, H_2SO_4 , MgSO_4 , H_3PO_4 , $\text{Fe}(\text{SO}_4)$, merkuri sulfat, asam perklorit, difenil karbazida, kasein, kertas saring Whatman, dan kertas pH.

Peralatan Penelitian

Drum eksperimen untuk penyamakan, mesin *staking wheel*, papan pentangan, mesin

seterika (*Finiplex Satilux*), alat semprot, dan alat uji kekuatan tarik (Zwick Roell ZO20 tipe KAP-TC serial 074170).

Metode Penelitian

Enzim *Bacillus megatorium* DSM-319 digunakan untuk perendaman kulit kambing dengan variasi konsentrasi enzim berturut-turut 0,5; 1 dan 1,5 %, waktu perendaman berturut-turut 1; 1,5 dan 2 jam, dan dibuat kontrol tanpa penggunaan enzim. Setelah proses perendaman selesai, kulit kambing kondisi basah di uji histologi metode fotomikrograf yang diambil dari penampang melintang epidermis kulit. Selanjutnya kulit-kulit tersebut diproses menjadi kulit jaket dengan tahapan proses sesuai standar proses yang dibakukan di laboratorium proses penyamakan kulit di Balai Besar Kulit, Karet, dan Plastik Yogyakarta.

Dilakukan analisis kadar protein kulit dan uji sifat fisika kulit yang meliputi kekuatan

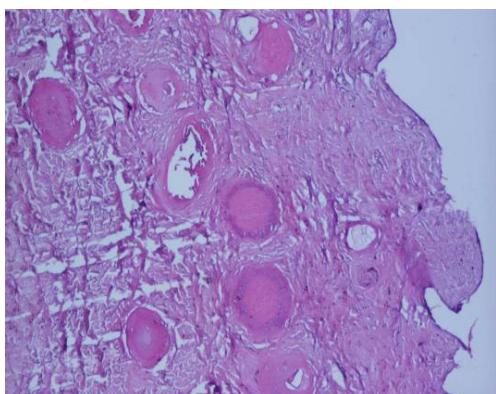
tarik, kemuluran, kekuatan sobek dan kekuatan jahit. Data hasil uji di analisis menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola faktorial 3x3. Mutu kulit di evaluasi berdasarkan SNI 4593 : 2011 kulit jaket domba kambing, (BSN, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Histologi Kulit Kambing Pasca Perendaman

Hasil pengamatan histologi kulit kambing dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2. Gambar 1 adalah hasil pengamatan menggunakan fotomikrograf perlakuan perendaman tanpa enzim dengan waktu perendaman 1 jam (kontrol). Tampak dari Gambar 1(a) lapisan epidermis kulit kambing tanpa enzim masih kelihatan agak utuh dan dari Gambar 1(b) bulu belum rontok.

Gambar 2 adalah hasil pengamatan menggunakan fotomikrograf perlakuan

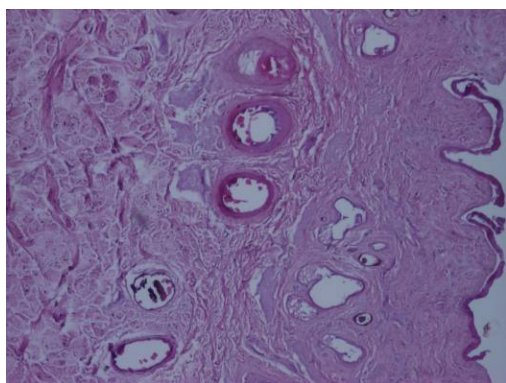


a



b

Gambar 1. Perendaman tanpa menggunakan enzim (kontrol) selama satu jam: (a) Hasil fotomikrograf, (b) Hasil foto kulit

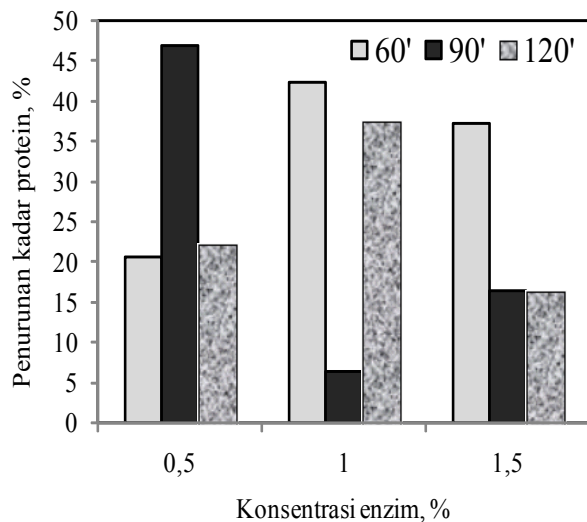


a



b

Gambar 2. Perendaman dengan enzim *Bacillus megatorium* DSM-319, waktu perendaman 1 jam, konsentrasi enzim 1%: (a) Hasil fotomikrograf, (b) Hasil foto kulit



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi enzim (%) dan waktu perendaman terhadap penurunan kadar protein

perendaman dengan enzim *Bacillus megatorium* DSM-319, waktu perendaman 1 jam, konsentrasi enzim 1%. Tampak dari Gambar 2(a) pengaruh pemakaian enzim *Bacillus megatorium* DSM-319, enzim tersebut mendigesti komponen dalam sambungan epidermal-derma sehingga epidermal terpisah dari dermal dan dari Gambar 2(b) sebagian besar bulu telah rontok.

Kadar Protein Kulit Kambing Pasca Perendaman

Kulit kambing sebelum dan sesudah perlakuan perendaman menggunakan enzim *Bacillus megatorium* DSM-319 dilakukan uji kadar protein. Hasil uji kadar protein disajikan pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa kadar protein turun pada kulit dengan konsentrasi enzim 0,5% selama 1,5 jam yaitu 46,84%. Namun demikian jika hal ini dikaitkan dengan hasil pengamatan fotomikrograf konsentrasi enzim 1%, waktu perendaman 1 jam, telah dapat merontokkan sebagian besar bulu rontok, dan waktu perendaman lebih singkat yang biasanya 2-3 hari menjadi hanya 1 jam, penurunan kadar protein optimal dijumpai pada perlakuan perendaman dengan konsentrasi enzim 1% dan waktu 1 jam sebesar 42,31%. Zambare *et al.* (2013) menyatakan bahwa enzim dapat menghilangkan protein kulit terutama protein globular sehingga struktur bekas serabut

kolagen kulit lebih terbuka. Bahkan Lu *et al.* (2011) dan Gutterres *et al.* (2009) menguatkan bahwa enzim dapat mempercepat proses perendaman kulit.

Enzim protease dalam media perendaman membantu penghilangan interfibril kulit sehingga kulit menjadi elastis dan lentur karena serabut kolagen mengalami depolimerisasi yang berakibat serabut-serabut kolagen menjadi terbuka (Kamini *et al.*, 1999).

Waktu perendaman 1 jam telah memberikan peran besar pada penurunan kadar protein kulit ($p \geq 0,05$). Oleh sebab itu perendaman kulit dalam larutan enzim proteolitik 0,5% dan waktu 1 jam telah cukup melarutkan protein kolagen kulit, sedang selebihnya tidak berpengaruh terhadap kelarutan protein kulit.

Kekuatan Tarik Kulit Kambing Pasca Perendaman

Hasil uji kekuatan tarik kulit kambing disajikan pada Tabel 1. Kekuatan tarik kulit kambing untuk semua perlakuan memenuhi persyaratan SNI 4593:2011 yang mempersyaratkan minimum 140 kg/cm² (BSN, 2011). Kekuatan tarik kulit kambing pasca perendaman berkisar 141,22-316,79 kg/cm². Dari uji Anova diperoleh F hitung sebesar 0,18 dengan signifikansi 0,83 ($p \geq 0,05$). Oleh karena $p \geq 0,05$ maka dinyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada kekuatan tarik antar perlakuan dengan varian konsentrasi enzim dan waktu perendaman. Kekuatan tarik kulit kambing tertinggi diperoleh dari perlakuan dengan konsentrasi enzim 1 %, waktu perendaman 1 jam yaitu sebesar 501,31 kg/cm². Hal ini terkait dengan penurunan protein tertinggi yaitu pada perlakuan perendaman dengan konsentrasi enzim 1% selama 1 jam dan terkecil 141,22 kg/cm² diperoleh dari kulit kambing yang direndam dengan konsentrasi enzim 1 % selama 2 jam.

Kemuluran Kulit Kambing Pasca Perendaman

Hasil uji kemuluran kulit kambing pasca perendaman disajikan pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa semua perlakuan menghasilkan kemuluran yang memenuhi persyaratan kemuluran sesuai SNI 4593:2011

Tabel 1. Kekuatan tarik kulit kambing hasil perlakuan dengan variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman (t)

Konsentrasi enzim (%)	Kekuatan tarik (kg/cm ²)		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	233,23	316,79	288,59
1,0	501,31	220,66	141,22
1,5	194,95	299,45	208,16

Tabel 2. Kemuluran kulit kambing pasca perendaman dengan variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman (t)

Konsentrasi enzim (%)	Kemuluran (%)		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	39,78	40,48	37,44
1,0	45,66	40,58	70,99
1,5	42,69	53,59	34,68

Tabel 3. Kekuatan sobek kulit kambing pasca perendaman dengan variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman (t)

Konsentrasi enzim (%)	Kekuatan sobek (kg/cm)		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	34,34	31,83	31,53
1,0	36,94	20,61	38,74
1,5	35,32	27,90	23,06

yaitu maksimum 60%, kecuali kulit kambing hasil perendaman dengan konsentrasi enzim 1,0% selama 2 jam. Hal ini kemungkinan disebabkan karena waktu perendaman yang lebih lama menyebabkan protein non-kolagen ikut terlarut sehingga kulit kambing menjadi sangat lentur dan hal ini tidak dikehendaki.

Hasil uji Anova diperoleh F hitung sebesar 1,13 dengan signifikansi 0,38 ($p \geq 0,05$). Oleh karena $p \geq 0,05$ maka tidak ada perbedaan yang signifikan pada pengaruh konsentrasi enzim dan waktu perendaman terhadap kemuluran kulit kambing pasca perendaman. Penurunan protein terbesar dijumpai pada kulit kambing yang direndam dengan konsentrasi enzim 1% dan waktu perendaman 1 jam. Kemuluran optimum yang diperoleh sebesar 45,66%. Proses perendaman secara enzimatik dapat mendegradasi protein globular dan mengurangi lapisan epidermis dengan ditandai turunnya kadar protein dan meningkatnya daya serap terhadap air. Perendaman secara sempurna akan menghasilkan kulit samak yang mempunyai sifat-sifat fisika lebih baik seperti mutu kekuatan tarik dan kemuluran yang memenuhi standar

sesuai dengan yang dipersyaratkan dalam SNI 4593:2011.

Kekuatan Sobek Kulit Kambing Pasca Perendaman

Hasil uji kekuatan sobek kulit kambing hasil penelitian disajikan pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa kekuatan sobek kulit kambing pasca perendaman untuk semua perlakuan memenuhi persyaratan SNI 4593: 2011 yaitu nilai minimum 12,5 kg/cm.

Hasil uji Anova diperoleh F hitung sebesar 0,27 dengan signifikansi 0,76 ($p \geq 0,05$). Oleh karena $p \geq 0,05$ maka dinyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada kuat sobek kulit kambing pasca perendaman dengan konsentrasi enzim dan waktu perendaman. Kekuatan sobek tertinggi dicapai oleh kulit kambing hasil perlakuan konsentrasi enzim 1% dan waktu perendaman 2 jam yaitu sebesar 38,74 kg/cm.

Kekuatan tarik dan kemuluran kulit kambing umumnya memiliki nilai yang saling berlawanan. Kulit dengan kekuatan tarik tinggi mengindikasikan tingkat kemulurannya rendah,

Tabel 4. Ketahanan gosok cat kondisi kering variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman

Konsentrasi enzim (%)	Ketahanan gosok cat		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	5	4/5	5
1,0	4/5	4	5
1,5	5	4/5	5

Tabel 5. Ketahanan gosok cat kondisi basah variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman

Konsentrasi enzim (%)	Ketahanan gosok cat		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	4	4	4/5
1,0	4	4/5	4/5
1,5	4	4/5	4/5

Tabel 6. Kelenturan kulit variasi konsentrasi enzim dan waktu perendaman

Konsentrasi enzim (%)	Kelenturan (mm)		
	t=1 jam	t=1,5 jam	t=2 jam
0,5	5,53	5,72	6,02
1,0	5,58	5,40	5,22
1,5	5,27	5,88	5,83

begitu pula hal sebaliknya. Terkait dengan penurunan protein terbesar yang dijumpai pada kulit kambing hasil perlakuan konsentrasi enzim 1% dengan waktu perendaman 1 jam, maka ketahanan sobek yang optimal sebesar 36,94 kg/cm.

Ketahanan Gosok Cat Kulit Kambing Pasca Perendaman

Tabel 4 menunjukkan bahwa ketahanan gosok cat kondisi kering kulit kambing pasca perendaman untuk semua perlakuan memenuhi persyaratan sesuai SNI 4593:2011 tentang Kulit Jacket Domba/Kambing yang mensyaratkan minimum 4/5. Hal ini terkait dengan penurunan protein terbesar pada kulit kambing hasil perendaman konsentrasi enzim 1% dengan waktu 1 jam, maka ketahanan gosok cat kondisi kering yang optimum adalah 4/5.

Persyaratan SNI 4593:2011 4593:2011 tentang Kulit Jacket Domba/Kambing menyebut-kan bahwa ketahanan gosok cat kondisi basah minimum 4 (sedikit lentur). Tabel 5 menunjukkan bahwa semua perlakuan

memenuhi persyaratan SNI 4593:2011. Terkait dengan penurunan protein terbesar hasil perendaman dengan konsentrasi enzim 1% selama 1 jam, maka ketahanan gosok cat kondisi basah yang optimum adalah 4.

Kelenturan Kulit Kambing Pasca Perendaman

Tabel 6 menunjukkan bahwa semua perlakuan perendaman memenuhi persyaratan SNI 4593:2011 dengan nilai minimum adalah 4. Kelenturan terbesar dicapai dari hasil perendaman dengan konsentrasi enzim 0,5% selama 2 jam yaitu sebesar 6,02. Tingginya nilai kelenturan kulit kambing pasca perendaman dapat disebabkan oleh lamanya perendaman yang menyebabkan protein non-kolagen banyak terlarut, sehingga kulit terlalu lentur. Enzim protease dalam media perendaman membantu penghilangan interfibril kulit sehingga kulit menjadi elastis dan lentur. Hal ini disebabkan oleh serabut kolagen mengalami depolimerisasi sehingga serabut-serabut kolagen menjadi terbuka (Kamini *et al.*, 1999). Hal ini erat

kaitannya dengan perlakuan penurunan protein terbesar hasil perlakuan konsentrasi enzim 1% selama 1 jam, maka nilai kelenturan optimal adalah 5,58 mm.

KESIMPULAN

Enzim *Bacillus megatorium* DSM-319 terbukti mengurangi pemakaian Na₂S sehingga membantu mewujudkan penyamakan kulit ramah lingkungan dan mempersingkat waktu perendaman. Perlakuan perendaman yang optimum adalah dengan konsentrasi enzim 1% selama 1 jam dapat menurunkan kadar protein sebesar 42,31%. Kulit jaket yang dihasilkan memenuhi persyaratan SNI 4593:2011 tentang Kulit Jaket Domba/Kambing dengan ditandai oleh kekuatan tarik 501,31 kg/cm², kemuluran 45,66%, kekuatan sobek 36,94 kg/cm, ketahanan gosok cat kondisi kering tidak luntur dengan nilai 4/5, dan ketahanan gosok cat kondisi basah sedikit luntur dengan nilai 4 dan kelenturan 5,27.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Kulit, Karet, dan Plastik yang telah memberi kepercayaan untuk melakukan penelitian serta seluruh anggota tim yang membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

BSN (Badan Standardisasi Nasional), 2011. *SNI-4593-2011 Kulit jaket domba/kambing*.
 Dangge, G., Jianzhong, M., Xiaoyang, Y., Bin, L. and Kangkang, W., 2010. Influence of three proteases on leather soaking process, *China Leather*, 9: 006.
 De Souza, F. R. and Gutterres, M., 2012. Application of enzymes in leather processing: A comparison between chemical and coenzymatic, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(3): 472-482.
 Dettmer, A., Ayub, M. A. Z. and Gutterres, M., 2011. Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather process, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3): 373-380.

D'souza, J. I. and Killedar, S. G., 2008. *Biotechnology and fermentation process*, Nirali Prakashan, Mumbai.
 Ghorbel-Bellaaj, O., Hayet, B. K., Bayoudh, A., Younes, I., Hmidet, N., Jellouli, K. and Nasri, M., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: Purification, characterization and biotechnological applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3): 679-686.
 Gutterres, M., Dettmer, A., Souza, F. R., Amaral, L. A. and Souza, M. F., 2009. Applications of biotechnology in Leather, *XXX International Union of Leather Technologists and Chemist Congress*, Beijing.
 Kamini, N.R., Hemachander, C., Mala, J. G. S. and Puvanakrishnan, R., 1999. Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Current Science*, 77(1): 80-86.
 Kanth, S. V., Venba, R., Jayakumar, G. C. and Chandrababu, N. K., 2009. Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: Role of acid protease, *Bioresource Technology*, 100(8): 2430-2435.
 Lu, A. X., Wu, Z. M. and Jiang, L., 2011. The application of protease in soaking process of beaver rabbit skin, *Leather Science and Engineering*, 3: 10-15
 Qiang, H., Xuepin, L., Mingrong, C. and Bi, S., 2009. Environmental friendliness enzymatic soaking and unhairing processes: Evaluation settling property of wastewater, *China Leather*, 9: 005.
 Sanghi, R. and Singh, V. (Eds), 2012. *Green chemistry for environmental remediaton*, John Wiley and Sons, New Jersey.
 Saran, S., Mahajan, R. V., Kaushik, R., Isar, J. and Saxena, R. K., 2013. Enzyme mediated beam house operations of leather industry: A needed step towards greener technology. *Journal of Cleaner Production*, 54: 315-322.
 Wahyuntari, B. dan Hendrawati, 2012. Properties of an extracellular protease of *Bacillus Megatorium* DSM-319 as depilating aid of hides, *Microbiology Indonesia*, 6(2): 77-82.

- Xiaoyang, Y., Jianzhong, M., Bin, L., Dangge, G and Wenxiong, M., 2008. Soaking process of CMI enzyme preparation, *China Leather*, 21: 009.
- Zambare, V. P., Nilegaonkar, S. S. and Kanekar, P. P., 2013. Protease production and enzymatic soaking of salt-preserved buffalo hides for leather processing, *IIOAB Letters*, 3(1): 1-7.